

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年12月 5日

出 願 番 号

Application Number:

特願2000-370445

出 願 人

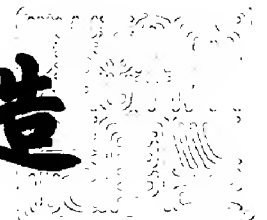
Applicant(s):

東洋紡績株式会社

2001年12月14日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2001-3107946

【書類名】 特許願

【整理番号】 CN00-0780

【提出日】 平成12年12月 5日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12Q 1/48

【発明者】

【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町 1 0 番 2 4 号 東洋紡績株式会社
敦賀バイオ研究所内

【氏名】 岸本 高英

【発明者】

【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町 1 0 番 2 4 号 東洋紡績株式会社
敦賀バイオ研究所内

【氏名】 曾我部 敦

【発明者】

【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町 1 0 番 2 4 号 東洋紡績株式会社
敦賀バイオ研究所内

【氏名】 服部 静夫

【発明者】

【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町 1 0 番 2 4 号 東洋紡績株式会社
敦賀バイオ研究所内

【氏名】 岡 正則

【特許出願人】

【識別番号】 000003160

【氏名又は名称】 東洋紡績株式会社

【代表者】 津村 準二

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 000619

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】	明細書	1
【物件名】	図面	1
【物件名】	要約書	1
【プルーフの要否】	要	

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ホモシステインの測定方法およびそれに用いる試薬組成物

【特許請求の範囲】

【請求項1】 試料に、ベタインーホモシステインメチル転移酵素およびジメチルグリシンオキシダーゼを作用せしめることによる該酵素反応より生成したホルムアルデヒド、サルコシンまたは過酸化水素の少なくとも1種を分析することを特徴とするホモシステインの測定方法。

【請求項2】 試料に、ベタインーホモシステインメチル転移酵素、ジメチルグリシンオキシダーゼおよびサルコシンオキシダーゼを作用せしめることによる該酵素反応より生成したホルムアルデヒドまたは過酸化水素を分析することを特徴とするホモシステインの測定方法。

【請求項3】 試料に、ベタインーホモシステインメチル転移酵素およびジメチルセチンを作用せしめることによる該酵素反応より生成した化合物を分析することを特徴とするホモシステインの測定方法。

【請求項4】 生成した化合物がメチオニンである請求項3記載のホモシステインの測定方法。

【請求項5】 緩衝液、ベタインーホモシステインメチル転移酵素、ジメチルグリシンオキシダーゼ、および該酵素による反応により生成するホルムアルデヒド、サルコシンまたは過酸化水素の少なくとも1種を分析するための試薬、を含有してなることを特徴とするホモシステイン測定用試薬組成物。

【請求項6】 緩衝液、ベタインーホモシステインメチル転移酵素、ジメチルグリシンオキシダーゼ、サルコシンオキシダーゼ、および該酵素による反応により生成するホルムアルデヒドまたは過酸化水素を分析するための試薬を少なくとも含有してなることを特徴とするホモシステイン測定用試薬組成物。

【請求項7】 緩衝液、ベタインーホモシステインメチル転移酵素、ジメチルセチンおよび該酵素による反応により生成する化合物を分析するための試薬を少なくとも含有してなることを特徴とするホモシステイン測定用試薬組成物。

【請求項8】 緩衝液、ベタインーホモシステインメチル転移酵素、ジメチルセチンおよび酵素による該反応により生成するメチオニンを分析するための試

薬を少なくとも含有してなることを特徴とするホモシステイン測定用試薬組成物

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ホモシステインの簡便で正確な測定方法、およびそのための試薬組成物に関する。

【0002】

【従来の技術】

ホモシステインは生体内では必須アミノ酸であるメチオニンが代謝を受けて生成される-SH基を有するアミノ酸であり、通常は低濃度で生体内に存在する。ホモシステインの代謝は、補因子としてビタミンB6、ビタミンB12、葉酸をそれぞれ必要とするシスタチオニンβシンターゼ、メチオニンシンターゼ、メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素などで規定されているが、血中ホモシステイン濃度の上昇をもたらすこれら代謝酵素の遺伝疾患であるホモシスチン尿症が動脈硬化症と関連のあることが報告されて以来、高ホモシステイン血症が脳梗塞、心筋梗塞、深部静脈血管症と関連付けられることが明らかにされ、現在では血中ホモシステイン濃度がこれら疾患の独立した危険因子として注目されている。

【0003】

従来から知られているホモシステインの測定法としては、HPLC（高速液体クロマトグラフィ）を用いてホモシステインを分離する方法（Clin.Chem.,39,p1590(1993)）、ホモシステインを蛍光物質で標識後、HPLC分析する方法（Clin.Chem.,35,p1921(1989)）S-アデノシルホモシステイン加水分解酵素を用いてアデノシンと反応させ、生成するS-アデノシルメチオニンをHPLC分析する方法（Biochem.Soc.14(6),p11712(1988)）などが挙げられる。また、ホモシステインを、5-メチルテトラヒドロ葉酸-ホモシステインメチル転移酵素を用いて5-メチルテトラヒドロ葉酸と反応させ、生成したメチオニンを更に蛍光物質と反応させたものをHPLC蛍光分析する方法（Anal.Biochem.,199,p112(1991)）なども報告されている。

【 0 0 0 4 】

また、HPLCによる分離を要しない方法として、ホモシステインをアデノシン、フルオレセイン標識S-アデノシルホモシステイン存在下でS-アデノシルホモシステイン加水分解酵素と反応させ、反応系に存在するS-アデノシルホモシステインを、抗S-アデノシルホモシステイン抗体を用いて蛍光偏向イムノアッセイを行なうことでホモシステインを測定する方法（特表平8-506478号公報）などが知られている。また、ホモシステインをホモシステインデスルフラゼで反応させ、生成するアンモニア、 α -ケト酸または硫化水素を測定する方法（特表2000-502262号公報）、ホモシステインに対して分解作用を有するL-メチオニン γ -リアーゼやo-アセチルホモセリン-リアーゼを用いて、チオール化合物の存在下で生成する硫化水素またはチオール化合物置換ホモシステインを測定する方法（特開2000-166597号公報）、ホモシステインの γ 位メルカプト基と置換可能な求核試薬の存在下、 γ -置換- α -アミノ酪酸合成酵素によりホモシステインから生成する、 γ -置換- α -アミノ酪酸または硫化水素を定量する方法（特開2000-228998号公報）なども報告されている。

【 0 0 0 5 】

上述のように、これまでもホモシステインを測定するとしては種々報告されているが、例えばHPLCを用いる方法では、精巧な分析装置を必要とする上、多量の検体を扱うには不適であり、イムノアッセイ法でも一般の生化学検査に比べて時間、費用を要することが知られている。また、一般に血中ホモシステイン量が、正常値で $10\mu\text{M}$ 程度若しくはそれ以下と微量であるため、上記酵素反応による比色分析法も、測定感度が不足していたり、あるいは使用する酵素の基質特異性により、検体中のホモシステイン以外の物質に作用するなどの点で、正確なホモシステイン量の測定には十分であるとは言えない。

【 0 0 0 6 】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、臨床検査における汎用自動分析機に適応可能な、酵素法を用いた簡便且つ正確な試料中のホモシステインの測定を可能にすることを目的とする。

【 0 0 0 7 】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記事情に鑑み、問題を解決すべく鋭意検討した結果、試料に、ベタインーホモシステインメチル転移酵素を作用させ、該反応により生成する化合物を分析することにより、簡便且つ正確にホモシステインを測定できることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【 0 0 0 8 】

即ち、本発明は以下のような構成からなる。

(1) 試料に、ベタインーホモシステインメチル転移酵素およびジメチルグリシンオキシダーゼを作用せしめることによる該酵素反応より生成したホルムアルデヒド、サルコシンまたは過酸化水素の少なくとも1種を分析することを特徴とするホモシステインの測定方法。

(2) 試料に、ベタインーホモシステインメチル転移酵素、ジメチルグリシンオキシダーゼおよびサルコシンオキシダーゼを作用せしめることによる該酵素反応より生成したホルムアルデヒドまたは過酸化水素を分析することを特徴とするホモシステインの測定方法。

(3) 試料に、ベタインーホモシステインメチル転移酵素およびジメチルセチンを作用せしめることによる該酵素反応より生成した化合物を分析することを特徴とするホモシステインの測定方法。

(4) 生成した化合物がメチオニンである(3)記載のホモシステインの測定方法。

(5) 緩衝液、ベタインーホモシステインメチル転移酵素、ジメチルグリシンオキシダーゼ、および該酵素による反応により生成するホルムアルデヒド、サルコシンまたは過酸化水素の少なくとも1種を分析するための試薬、を含有してなることを特徴とするホモシステイン測定用試薬組成物。

(6) 緩衝液、ベタインーホモシステインメチル転移酵素、ジメチルグリシンオキシダーゼ、サルコシンオキシダーゼ、および該酵素による反応により生成するホルムアルデヒドまたは過酸化水素を分析するための試薬を少なくとも含有してなることを特徴とするホモシステイン測定用試薬組成物。

(7) 緩衝液、ベタインーホモシステインメチル転移酵素、ジメチルセチンおよび該酵素による反応により生成する化合物を分析するための試薬を少なくとも含有してなることを特徴とするホモシステイン測定用試薬組成物。

(8) 緩衝液、ベタインーホモシステインメチル転移酵素、ジメチルセチンおよび該酵素による反応により生成するメチオニンを分析するための試薬を少なくとも含有してなることを特徴とするホモシステイン測定用試薬組成物。

【0009】

【発明の実施の形態】

本発明のホモシステインの測定方法は、試料にベタインーホモシステインメチル転移酵素、ジメチルグリシンオキシダーゼ、若しくは更にサルコシンオキシダーゼを作用させ、該酵素反応よりホモシステインから生成するホルムアルデヒド、サルコシンまたは過酸化水素を分析することを特徴とする。

【0010】

本発明において使用されるベタインーホモシステインメチル転移酵素 (EC 2.1.1.5) は、ベタインをもう一方の基質として、ホモシステインに作用し、ジメチルグリシンとメチオニンを生成する酵素である。例えば、哺乳動物やシュードモナス (*Pseudomonas*) 属、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属などの微生物から採取することが可能である。

【0011】

ジメチルグリシンオキシダーゼは、ベタインーホモシステインメチル転移酵素により生成したジメチルグリシンに作用して、サルコシン、ホルムアルデヒドおよび過酸化水素に分解する酵素であり、例えばシリンドロカーボン (*Cylindrocapsa*) 属、アクロモバクター (*Achromobacter*) 属、アースロバクター (*Arthrobacter*) 属などの微生物から採取することができる。

ジメチルグリシンオキシダーゼにより生成するサルコシンに作用し、グリシン、ホルムアルデヒドおよび過酸化水素を生成するサルコシンオキシダーゼ (EC 1.5.3.1) については、各種動物や、アースロバクター (*Arthrobacter*) 属、ペニシリウム (*Penicillium*) 属、バチルス (*Bacillus*) 属微生物などから採取することが可能である。また、市販の酵素を使用することもできる。

【0012】

また、上記酵素は、それぞれの酵素蛋白質をコードする遺伝子を取り出し、遺伝子工学的技術により発現させた酵素であってもよい。更に、例えば酵素蛋白質の比活性や安定性を向上させるなど、酵素特性の改良をもたらすように遺伝子を改変したものも含まれる。

【0013】

ベタイン-ホモシステインメチル転移酵素とジメチルグリシンオキシダーゼ、若しくは更にサルコシンオキシダーゼにより生成するホルムアルデヒドは、Hantz 試薬、ホルムアルデヒド脱水素酵素 (EC 1.2.1.1)、ホルムアルデヒドオキシダーゼなどにより、紫外部、可視部の吸光度、あるいは蛍光により測定することができる。例えば、ホルムアルデヒド脱水素酵素により NAD (ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド) より生成する還元型 NAD は、ジアホラーゼやメチルフェナジウムメチルスルフェートのような電子伝達体の存在下で、テトラゾリウム塩を還元してホルマザン色素を生じるので、これを測定することでホモシステインを定量することができる。

【0014】

ホルムアルデヒド脱水素酵素は哺乳動物、酵母、細菌など幅広く存在することが知られており、これら給源より直接、もしくは該酵素の遺伝子を遺伝子工学的手法で作製した組換え体より採取可能であり、また、市販の酵素を使用しても良い。例えば、ホルムアルデヒドと NAD からギ酸と還元型 NAD を生成する、還元型グルタチオン非依存性の酵素としてシュードモナス (*Pseudomonas*) 属、アースロバクター (*Arthrobacter*) 属、メチロフィラス (*Methylophilus*) 属細菌由来の、還元型グルタチオン依存性の酵素としてはハンゼヌラ (*Hansenula*) 属、エシェリヒア (*Eschericia*) 属、ロドバクター (*Rhodobacter*) 属などの細菌由来の酵素が公知であり、またキャンディダ (*Candida*) 属の酵母由来の酵素が市販のものとして用いることができる。

【0015】

ジメチルグリシンオキシダーゼおよび、またはサルコシンオキシダーゼにより生成する過酸化水素は、紫外部の吸光度を直接測定、カタラーゼと酸化チタン試

薬 (Agric. Biol. Chem., 38, p1213 (1974)) による比色定量、過マンガン酸カリウムを用いた滴定定量などが可能であるが、高感度測定の為には、ペルオキシダーゼ存在下、酸化系発色試薬及び、必要に応じて4-アミノアンチピリンや3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンなどのカップラーと反応させ、生成する色素を測定することにより定量することが好ましい。使用する発色試薬は特に制限されるものではなく、各種の市販されているものなどを使用することができるが、具体例としてN-エチル-N-スルホプロピル-m-アニシジン、N-エチル-N-スルホプロピル-アニリン、N-メチル-N-スルホプロピル-アニリン、N-ブチル-N-スルホプロピル-アニリン、N-エチル-N-スルホプロピル-3,5-ジメトキシアニリン、N-スルホプロピル-3,5-ジメトキシアニリン、N-エチル-N-スルホプロピル-3,5-ジメチルアニリン、N-エチル-N-スルホプロピル-m-トルイジン、N-エチル-N-スルホプロピル-o-トルイジン、N-エチル-N-スルホプロピル-p-トルイジン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-アニシジン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)アニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン、N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメチルシアニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-トルイジン、N-スルホプロピルアニリン、p-クロロフェノール、p-ブロモフェノール、2,4-ジクロロフェノール、p-ヒドロキシ安息香酸、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン、N-(3-スルホプロピル)3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン、N,N,N',N',N'',N''-ヘキサ(3-スルホプロピル)-4,4',4''-トリアミノトリフェニルメタンなどが挙げられる。また、過酸化水素は直接、またはカタラーゼ共存下で酸素の消費をセンサーを用いてモニタリングすることでも測定することができる。

ジメチルグリシンオキシダーゼにより生成するサルコシンは、サルコシンオキシダーゼを作用させることにより生成するホルムアルデヒドまたは過酸化水素を上述方法により分析できる他、電子伝達体、発色色素の存在下でサルコシン脱水

素酵素を作用させ、生成する色素を測定することでも分析することが可能である。電子伝達体としては、ジアホラーゼやメチルフェナジウムメチルスルフェート、メチレンブルー、フェリシアン化カリウムなどが例示される。また、色素としてはテトラゾリウム塩、インドフェノールなどが挙げられる。また、サルコシン脱水素酵素は哺乳動物やシュードモナス (*Pseudomonas*) 属微生物などから直接、もしくは該酵素の遺伝子を遺伝子工学的手法で作製した組換え体より採取可能である。

【0016】

ベタインーホモシステインメチル転移酵素は、ホモシステインへのメチル供与体としてベタイン以外にジメチルセチンを効率良く利用できることが知られており (*J. Bacteriol.*, vol. 113, No. 1, p218 (1973))、該酵素反応により生成する化合物、例えばメチオニンを分析することで、試料中のホモシステインを測定することができる。メチオニンは、公知の方法を用いて測定することができるが、例えばニトロプルシド反応やニンヒドリン反応などの公知比色定量法 (例えば、*J. Biol. Chem.*, 176, p789 (1948)) により直接測定する方法、メチオニンラセマーゼやアミノ酸オキシダーゼ、メチオニナーリアーゼで生成されるケト酸、アンモニア、過酸化水素を測定する方法が挙げられる。ケト酸は、例えば3-メチル-2-ベンゾチアゾロンヒドラゾンとの反応を利用した比色定量法、アンモニアは、例えばインドフェノール法による比色定量や、*o*-フタルアルデヒドとの反応生成物の蛍光分析などにより、過酸化水素は上記方法により測定することができる。メチオニンラセマーゼはシュードモナス (*Pseudomonas*) 属、ストレプトコッカス (*Streptococcus*) 属細菌などにより産生されることが知られている。アミノ酸オキシダーゼは、哺乳動物、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属細菌由来の酵素などが、また、メチオニンに特異的に作用するものとして蛇毒中に含まれるものが公知である。メチオニナーリアーゼはシュードモナス (*Pseudomonas*) 属、クロストリジウム (*Clostridium*) 属などの細菌由来の酵素が公知であり、これらより直接、もしくは該酵素遺伝子を取り出して遺伝子工学的手法により作製した組換え体より採取することが可能である。

【0017】

本発明において、測定される試料が生体試料、特に血漿や尿の場合、含有されるホモシステインは、大部分がアルブミンのような循環蛋白質との結合型、あるいはシステインやホモシステイン同士のジスルフィド結合体として存在する。従って、総ホモシステインを測定する際には、予め試料を還元剤や酵素反応により処理し、遊離ホモシステインを生成させることが必要となる。

【 0 0 1 8 】

この場合に用いられる還元剤としては、例えばチオール類、水素化ホウ素類、アマルガム、ホスフィンやホスホチオエートなどを例示することができる。具体的には、チオール類としてはジチオスレイトール、ジチオエリスリトール、２－メルカプトエタノール、２－メルカプトメチルアミン、システイン、シスタミン、システインチオグリコレート、チオグリコール酸、還元型グルタチオンなど、水素化ホウ素類としては水素化ホウ素ナトリウムなど、アマルガムとしてはナトリウムアマルガムなどが挙げられる。

【 0 0 1 9 】

本発明におけるホモシステインの測定方法においては、ベタインーホモシステインメチル転移酵素、ジメチルグリシンオキシダーゼ、またはベタインーホモシステインメチル転移酵素、ジメチルグリシンオキシダーゼ、サルコシンオキシダーゼ、ジメチルセチン、ホルムアルデヒド分析試薬、サルコシン分析試薬、過酸化水素分析試薬、メチオニン分析試薬などは、同一の試薬中に保存することもできるが、互いに干渉を与える成分が存在する、または単一の保存条件で安定性の確保が難しい場合には、構成成分を分割して保存することが好ましい。

【 0 0 2 0 】

本発明におけるホモシステイン測定用試薬組成物は、緩衝液、ベタインーホモシステインメチル転移酵素、ジメチルグリシンオキシダーゼ、および該酵素による反応により生成するホルムアルデヒド、サルコシンまたは過酸化水素の少なくとも１種を分析するための試薬、を少なくとも含有してなる。さらにサルコシンオキシダーゼを含んでいてもよい。ベタインーホモシステインメチル転移酵素、ジメチルグリシンオキシダーゼ、サルコシンオキシダーゼに関しては、上述したようなものが好ましいが、特に限定はされない。ここで、該酵素による反応によ

り生成するホルムアルデヒド、サルコシン、または過酸化水素を分析するための試薬とは、具体的には上述したような原理に基づくものが挙げられる。ホルムアルデヒドを分析するための試薬としては、ホルムアルデヒド脱水素酵素、ホルムアルデヒドオキシダーゼ、H a n z 試薬、C T A 試薬 (J.Biol.Chem.231,p813(1958))、P u r p a l d 試薬 (Anal.Biochem.234(1),p50,(1996)) やフェニルヒドラジン、フェリアン化カリウム、クロロホルム、メタノールを組み合わせた試薬などがある。過酸化水素を分析するための試薬としては、ペルオキシダーゼ、酸化系発色試薬及び、必要に応じて4-アミノアンチピリンや3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンなどのカップラー、カタラーゼ、酸化チタン試薬、過マンガン酸カリウムなどがある。また、サルコシンを分析するための試薬としては、サルコシンオキシダーゼ及び該酵素反応により生成するホルムアルデヒド、過酸化水素を分析する上記試薬、サルコシン脱水素酵素、電子伝達体、発色色素などがある。

【 0 0 2 1 】

また、本発明におけるホモシステイン測定用試薬組成物の別な態様としては、緩衝液、ベタイン-ホモシステインメチル転移酵素、ジメチルセチン、および該酵素による反応により生成する化合物を含むものであってもよい。該酵素による反応により生成する化合物として、具体的にはメチオニンが挙げられる。該化合物を分析するための試薬とは、具体的には上述したような原理に基づくものが挙げられ、ニトロプルシド試薬、ニンヒドリン試薬、メチオニンラセマーゼ、アミノ酸オキシダーゼ、メチオニントランスフェラーゼ、上記のケト酸分析試薬、上記のアンモニア分析試薬、上記の過酸化水素分析試薬などがある。

【 0 0 2 2 】

本発明の試薬組成物において使用される緩衝液としては、トリス塩酸緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、G O O D 緩衝液などが挙げられる。トリス塩酸緩衝液、リン酸緩衝液は濃度、温度によりpHの変動を受けやすいが、安価という利点がある。一方、G O O D 緩衝液は具体的にはM E S、B i s - T r i s、A D A、P I P E S、A C E S、B E S、M O P S、T E S、H E P E S、T r i c i n e、B i c i n e、P O P S O、T A P S、C H E S、C A P Sなどが例

示され、臨床診断薬用として多用されている。これら緩衝液の種類、濃度および pH は、各試薬成分の保存および酵素反応など目的に応じて一種もしくは複数が選択されるが、いずれの緩衝液を用いるに際しても、酵素反応時の pH としては 5.0～10.0 の範囲で使用されることが好ましい。

【 0 0 2 3 】

また、本発明の試薬組成物は、金属塩、蛋白質、アミノ酸、糖、有機酸などを安定化剤として使用することができる。金属塩としてはナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、鉄、銅、亜鉛、マンガンなどの塩が挙げられる。蛋白質としては酵素反応に影響を与えないものが望ましいが、例えば牛血清アルブミン、卵アルブミン、ゼラチンなどが挙げられる。アミノ酸としては、グリシン、リジン、グルタミン酸、グリシルグリシン、ポリリジンなどを挙げるができる。糖としては、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖およびこれらの誘導体を用いることができる。具体的には、グルコース、フラクトース、ガラクトース、マンノース、キシロース、ラクトース、シュクロース、マルトース、トレハロース、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトシルシクロデキストリン、 α -シクロデキストリン、 β -シクロデキストリン、 γ -シクロデキストリン、デキストリン、アミロース、グリコーゲン、デンプン、イヌリン、グルコサミン、イノシトール、マンニトール、ソルビトール、リビトール、デオキシグルコースなどが挙げられる。有機酸としては、 α -ケトグルタル酸、リンゴ酸、フマル酸、グルコン酸、コール酸、デオキシコール酸などが例示される。その他、ホウ酸、ホウ砂、塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫酸アンモニウム、グリセロール、フィコールなども使用可能である。

【 0 0 2 4 】

更に、本発明の試薬組成物には、試薬性能に悪影響を及ぼさない範囲で防腐剤や界面活性剤を添加してもよい。防腐剤としてはアジ化ナトリウム、キレート剤、各種抗生物質、防菌剤、防黴剤などが挙げられる。界面活性剤としては、非イオン性界面活性剤、陽イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、両性界面活性剤が挙げられる。具体的には、トリトン X-100、コール酸ナトリウム、CHAPS などを使用することが好ましい。

【 0 0 2 5 】

【実施例】

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【 0 0 2 6 】

実施例 1 ベタインーホモシステインメチル転移酵素の取得

本発明のベタインーホモシステインメチル転移酵素の活性測定は以下の試薬及び測定条件で行った。

【 0 0 2 7 】

〈試薬〉

試薬 A 5 0 m M リン酸カリウム緩衝液 (p H 7 . 5)

試薬 B 1 0 0 m M D L - ホモシステイン溶液 (試薬 A で溶解)

試薬 C 1 0 0 m M ベタイン (試薬 A で溶解)

試薬 D 0 . 2 % ペンタシアノアンミン鉄 (III) ナトリウム水溶液

試薬 E 酢酸

試薬 F 1 0 % 亜硝酸ナトリウム水溶液

【 0 0 2 8 】

〈測定条件〉

酵素溶液 2 . 3 m l に試薬 B、試薬 C を各 0 . 0 7 5 m l、0 . 1 2 5 m l を加えて混和後、3 7 ℃ で 1 時間反応させる。反応終了後、直ちに試薬 D を 5 m l 加えて攪拌し、一分間放置後、更に試薬 E、試薬 F の順に各 1 m l ずつ加えて攪拌する。室温で 3 0 分間放置後 5 2 0 m における吸光度を測定する。試薬 A に溶解した L - メチオニンを酵素溶液の代わりに用いて同様の手順にて測定した吸光度より標準曲線を作成し、これから酵素反応により生成したメチオニンの量を測定する。上記条件にて 1 時間に 1 マイクロモルのメチオニンを生成する酵素量を 1 単位 (U) とする。

【 0 0 2 9 】

遺伝子の塩基配列が公知であるヒト由来のベタインーホモシステインメチル転移酵素 (J.Biol.Chem.Vol.271,No.37,p22831(1998)) をコードする遺伝子全長が

増幅可能な2種のプライマー（配列表の配列番号1および2に記載）を作成し、これを用いてヒト肝臓cDNA（クロンテック製）を鋳型として、ポリメラーゼチェーンリアクション（PCR）法によりヒト由来のベタイン-ホモシステインメチル転移酵素をコードするDNA断片を増幅した。PCRは以下に示す反応液組成及び反応条件にて実施した。

【0030】

〈反応液組成〉

KODPlus DNAポリメラーゼ（東洋紡績製） 1Unit/50 μ l

10倍濃度添付バッファー 5 μ l/50 μ l

鋳型cDNA 1.5 μ g/50 μ l

dATP、dTTP、dGTP、dCTP 各0.2mM

プライマー 各25pmols/50 μ l

【0031】

〈反応条件；下記（2）～（4）を計30サイクル実施した〉

（1）95℃、2分間（変性）

（2）95℃、30秒間（変性）

（3）60℃、30秒間（アニーリング）

（4）68℃、1分間（伸長反応）

【0032】

PCR反応後、反応液の一部をアガロースゲル電気泳動に供し、約1.2Kbpの単一の増幅バンドを確認した。この増幅断片をDNA断片精製キット（MagExtractor PCR&Gel Clean Up；東洋紡績製）を用いて回収した後、このDNA断片をNdeIおよびBamHI制限酵素にて処理した。次いで、pET11aプラスミド（ストラタジーン製）をNdeIおよびBamHI制限酵素で処理し、これを上記DNA断片とT4 DNAリガーゼ（東洋紡績製）を用いて連結した。これを用いてEpicurian Coli BL21（DE3）-CodonPlusTM-RIL コンピテントセル（ストラタジーン製）を形質転換し、アンピシリンを含むLB寒天培地（1%ポリペプトン、0.5%酵母エキス、0.5%NaCl、100 μ g/mlアンピシリン；pH7.2）に塗布し、37℃で16時間培養した。

【 0 0 3 3 】

得られたコロニーは、アンピシリンを含むLB培地60mlで30℃、16時間振とう培養後、塩化亜鉛およびアンピシリンを含む×2YT培地（1.6%ポリペプトン、1%酵母エキス、0.5%NaCl、34μg/ml塩化亜鉛、100mg/mlアンピシリン；pH7.2）6Lに接種し、37℃で通気攪拌培養した。約2.5時間後、培養液の600nmの吸光度が約1.0に達した時点で、イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシドを1mMになるように添加し、更に4時間培養を行った。培養終了後、培養液を遠心分離し、菌体を5mM 2-メルカプトエタノール、1mM EDTAを含む20mMリン酸カリウム緩衝液（pH7.5）に懸濁した。次いで菌体フレンチプレスで破碎し、遠心分離を行い、上清液を得た。得られた酵素液をポリエチレンジオキサンによる除核酸処理後、セファデックスG-25による脱塩処理、DEAEセファロスクロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、スーパーデックス200ゲル濾過クロマトグラフィーにより分離精製し、精製酵素標品約50mgを得た。該方法により得た標品は、電気泳動（SDS-PAGE）的に単一なバンドを示し、この時の比活性は約2.1U/mg-蛋白質であった。

【 0 0 3 4 】

実施例2 ジメチルグリシンオキシダーゼの取得

本発明のジメチルグリシンオキシダーゼの活性測定は以下の試薬及び測定条件により行った。

【 0 0 3 5 】

〈試薬〉

試薬A 100mMジメチルグリシン溶液（100mMリン酸カリウム緩衝液（pH7.5）で溶解）

試薬B 0.1%4-アミノアンチピリン水溶液

試薬C 0.1%フェノール水溶液

試薬D 25U/mlペルオキシダーゼ（東洋紡績製；PEO-301）水溶液

【 0 0 3 6 】

〈測定条件〉

試薬A、試薬B、試薬Cおよび試薬Dを各1.5 ml、0.3 ml、0.6 ml、0.6 mlの割合で混合し、試薬混液を作成する。この試薬混液3 mlを37℃で約5分間予備加温した後、0.1 mlの酵素溶液を加えて混和し、37℃で4分間反応させる。この時、500 nmにおける1分間当たりの吸光度変化を測定する。盲検は酵素溶液の代わりに蒸留水を試薬混液に加えて、以下同様に吸光度変化を測定する。上記条件にて1分間に1マイクロモルの過酸化水素を生成する酵素量を1単位(U)とする。

【0037】

アルスロバクター・ニコチアナエ (*Arthrobacter nicotianae*) IF014234株を60 ml LB培地(1%ポリペプトン、0.5%酵母エキス、0.5% NaCl; pH 7.2)に一白金耳植菌し、30℃、16時間振とう培養後、6 Lのジメチルグリシンオキシダーゼ生産培地(2%ベタイン、1%ポリペプトン、1.6%酵母エキス、1.4%リン酸水素二カリウム、0.55%リン酸二水素一カリウム)に移し、30℃、40時間通気攪拌培養した。培養終了後、培養液を遠心分離し、20 mMリン酸カリウム緩衝液(pH 7.5)に懸濁した。次いで菌体をガラスビーズで破碎し、遠心分離を行い上清液を得た。得られた酵素液をポリエチレンイミンによる除核酸処理および硫酸分画後、セファデックスG-25による脱塩処理、DEAEセファロースクロマトグラフィー、フェニルセファロースクロマトグラフィー、スーパーデックス200ゲル濾過クロマトグラフィーにより分離精製し、精製酵素標品約110 mgを得た。該方法により得た標品は電気泳動(SDS-PAGE)的に単一なバンドを示し、この時の比活性は約9.3 U/mg蛋白質であった。

【0038】

実施例3 ホモシステイン標準液の測定(1)

種々の濃度のホモシステイン標準液30 μ Lを、0.8 U/ml ベタイン-ホモシステインメチル転移酵素(実施例1で調製)、5 U/ml ジメチルグリシンオキシダーゼ(実施例2で調製)、5 U/ml ペルオキシダーゼ(東洋紡績製; PEO-301)、10 mMベタイン、1 mM 4-アミノアンチピリン、1 m

M N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3-メチルアニリン（同仁化学研究所製）をそれぞれ含む50 mMリン酸カリウム緩衝液（pH 7.5）270 μ lと混合し、37℃で10分間反応させ、546 nmの吸光度を、HITACHI 7060形自動分析装置を用いて測定した。反応終了時の吸光度とホモシステイン濃度の関係は図1に示す通りであり、ホモシステイン濃度が0～200 μ Mの範囲において直線性を示し、定量が可能であった。

【0039】

実施例4 ホモシステイン標準液の測定（2）

種々の濃度のホモシステイン標準液30 μ lを、0.8 U/ml ベタイン-ホモシステインメチル転移酵素（実施例1で調製）、5 U/ml ジメチルグリシンオキシダーゼ（実施例2で調製）、5 U/ml サルコシンオキシダーゼ（東洋紡績製；SAO-341）、5 U/ml ペルオキシダーゼ（東洋紡績製；PEO-301）、10 mM ベタイン、0.2 mM N,N,N',N',N'',N''-ヘキサ（3-スルホプロピル）-4,4',4''-トリアミノトリフェニルメタン（同仁化学研究所製）をそれぞれ含む50 mMリン酸カリウム緩衝液（pH 7.5）270 μ lと混合し、37℃で10分間反応させ、600 nmの吸光度を、HITACHI 7060形自動分析装置を用いて測定した。反応終了時の吸光度とホモシステイン濃度の関係は図2に示す通りであり、ホモシステイン濃度が0～20 μ Mの範囲において直線性を示し、定量が可能であった。

【0040】

実施例5 ホモシステイン標準液の測定（3）

種々の濃度のホモシステイン標準液30 μ lを、0.8 U/ml ベタイン-ホモシステインメチル転移酵素（実施例1で調製）、5 U/ml ジメチルグリシンオキシダーゼ（実施例2で調製）、5 U/ml サルコシンオキシダーゼ（東洋紡績製；SAO-341）、2 U/ml ホルムアルデヒド脱水素酵素（東洋紡績製；FRD-201）、10 mM ベタイン、1 mM NADをそれぞれ含む50 mMリン酸カリウム緩衝液（pH 7.5）270 μ lと混合し、37℃で10分間反応させ、340 nmの吸光度を、HITACHI 7060形自動分析装置を用いて測定した。反応終了時の吸光度とホモシステイン濃度の関係は図3に示す通

りであり、ホモシステイン濃度が0～100 μ Mの範囲において直線性を示し、定量が可能であった。

【0041】

実施例6 ホモシステイン標準液の測定(4)

実施例5と同一条件で反応させた反応液200 μ lを96穴マイクロプレートに移し、フルオロスキャンII自動蛍光光度計(ラボシステムズ社製)を用いて、励起波長355 nm、測定波長460 nmの蛍光光度を測定した。盲検としてホモシステイン溶液の代わりに蒸留水を用いて同様に反応させたものを使用した。反応液の蛍光光度とホモシステイン濃度の関係は図4に示す通りであり、ホモシステイン濃度が0～100 μ Mの範囲において直線性を示し、定量が可能であった。

【0042】

実施例7 ホモシステイン標準液の測定(5)

種々の濃度のホモシステイン標準液200 μ lを、30 mMジメチルセチン(甲南化工製)、4 U/ml ベタインーホモシステインメチル転移酵素(実施例1で調製)をそれぞれ含む50 mMリン酸カリウム緩衝液(pH 7.5) 50 μ lと混合し、37℃で30分間反応させた後、0.2%ペンタシアノアンミン鉄(III)ナトリウム水溶液を加えて攪拌し、1分間放置後、更に酢酸、10%亜硝酸ナトリウム水溶液の順に各0.1 mlずつ加えて攪拌した。室温で30分間放置後520 nmにおける吸光度を測定した。盲検としてホモシステイン溶液の代わりに蒸留水を用いて同様に反応させたものを使用した。吸光度とホモシステイン濃度の関係は図5に示す通りであり、ホモシステイン濃度が0～2 mMの範囲において直線性を示し、定量が可能であった。

【0043】

【発明の効果】

上述したように、本発明の方法によれば、ホモシステインを含有する試料に、ベタインーホモシステインメチル転移酵素を作用させ、該酵素反応により生成する化合物を分析することで、汎用の自動分析装置などを用いて簡便且つ高感度にホモシステインを定量することができる。特に血中のホモシステイン量は動脈硬

化症の危険因子として注目されており、本発明のホモシステイン測定法は簡便で安価な方法として普及することが期待される。

【 0 0 4 4 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110>TOYO BOSEKI KABUSHIKI KAISHA

<120>METHOD OF HOMOCYSTEINE ASSAY AND COMPOSITION OF REAGENT FOR HOMOCYSTEINE ASSAY

<130>00-0780 ←出願する際に付けられるケース番号を記入します。

<140>

<141>2000-12-05 ←出願する日付を記入します。

<160>2

<170>PatentIn Ver.2.1

<210>1

<211>40

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Description of Artificial Sequence

<400>1

gcaattccat atgccacccg ttgggggcaa aaaggccaag

40

<210>2

<211>40

<212>DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>Description of Artificial Sequence

<400>2

atcgcgatc caggctactg tgatttgaat tttgttttt

40

【図面の簡単な説明】

【図 1】

実施例 3 における、吸光度とホモシステイン濃度との関係を示す図である。

【図 2】

実施例 4 における、吸光度とホモシステイン濃度との関係を示す図である。

【図 3】

実施例 5 における、吸光度とホモシステイン濃度との関係を示す図である。

【図 4】

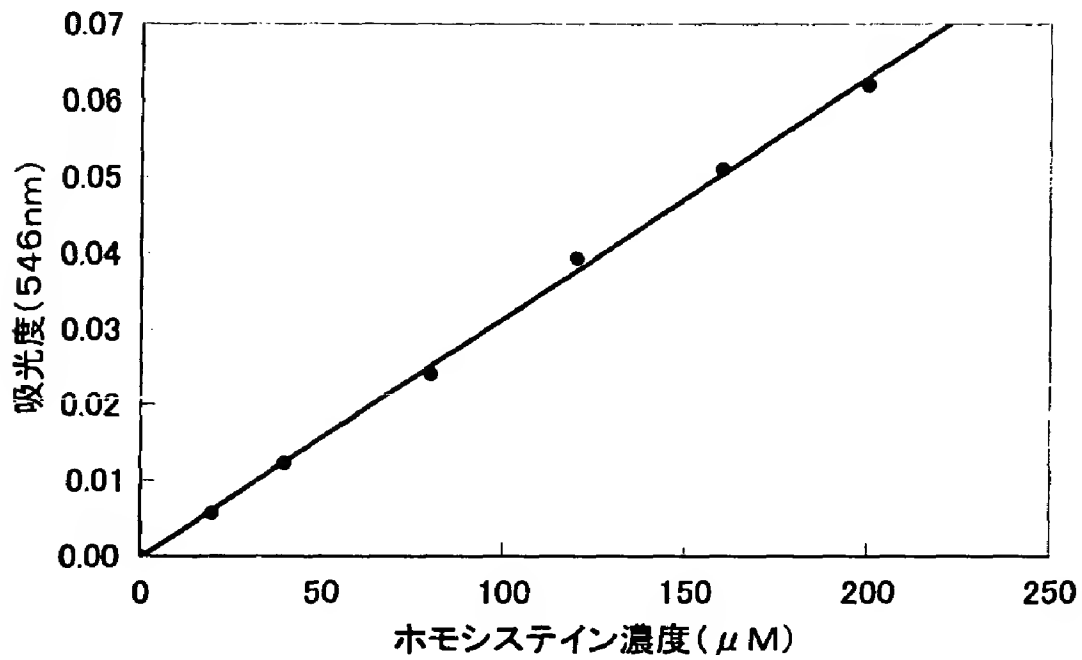
実施例 6 における、吸光度とホモシステイン濃度との関係を示す図である。

【図 5】

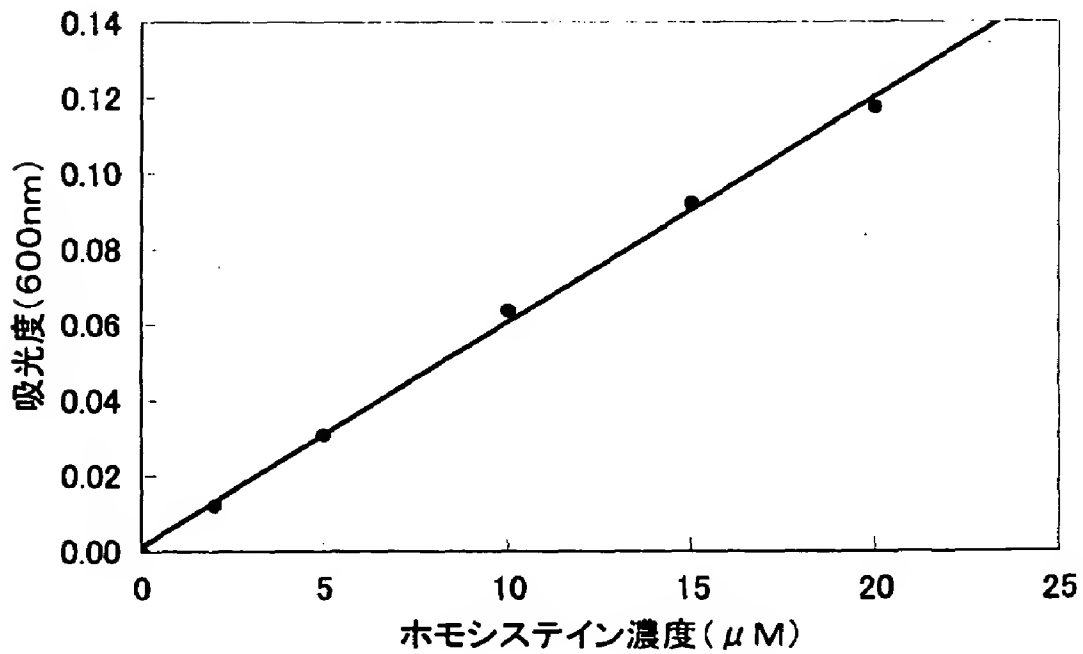
実施例 7 における、吸光度とホモシステイン濃度との関係を示す図である。

【書類名】 図面

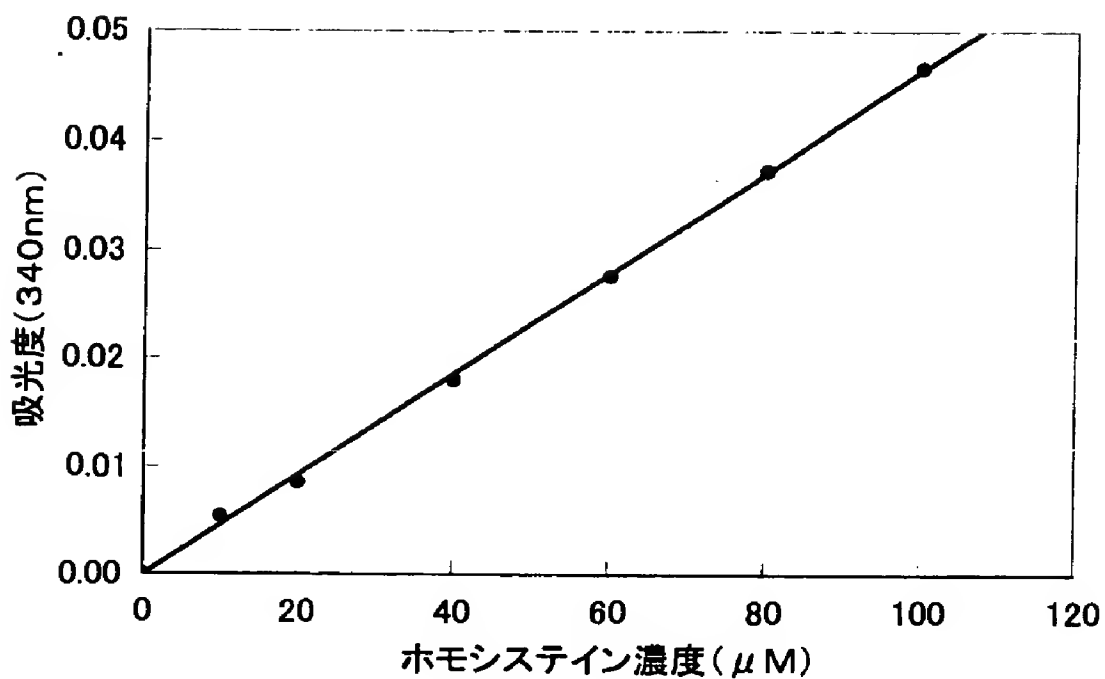
【図 1】



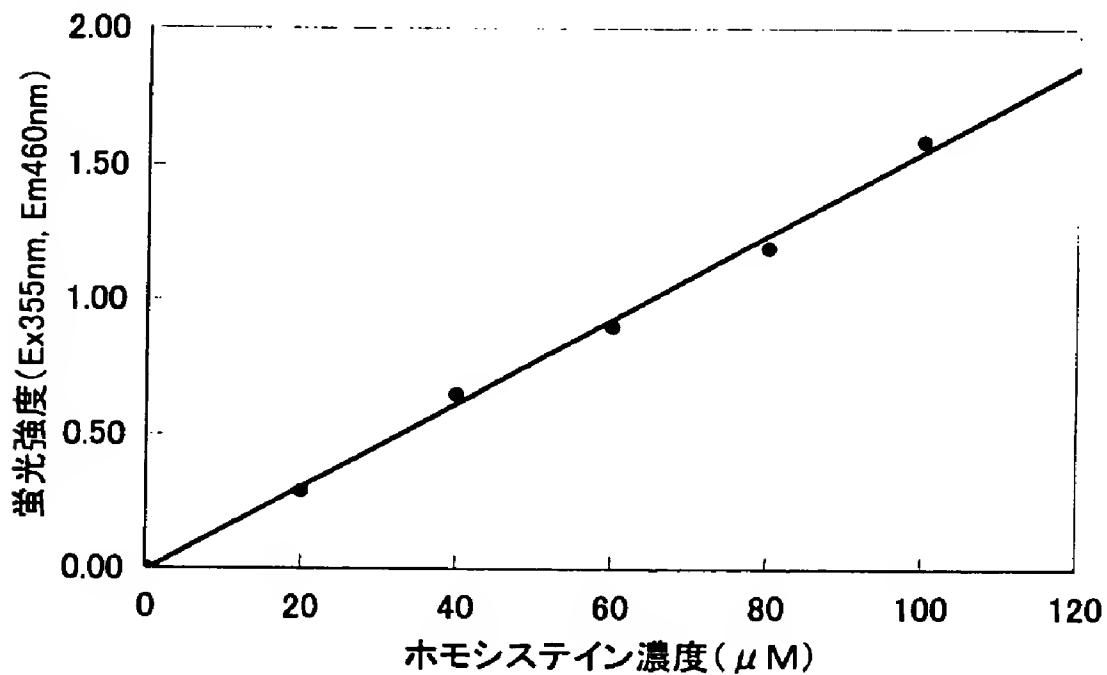
【図 2】



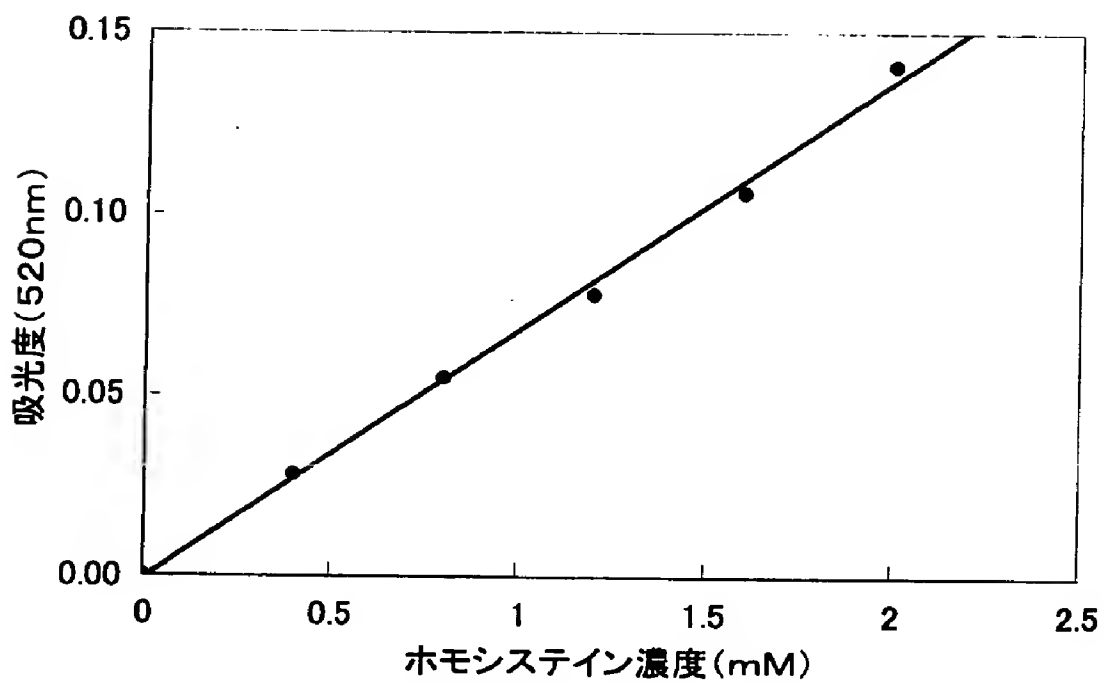
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】臨床検査における汎用自動分析機に適応可能な、酵素法を用いた簡便且つ正確な試料中のホモシステインの測定を可能にする。

【解決手段】試料に、ベタインーホモシステインメチル転移酵素およびジメチルグリシンオキシダーゼを作用せしめることによる該酵素反応より生成したホルムアルデヒドまたは過酸化水素を分析することを特徴とするホモシステインの測定方法。

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 {000003160}

1. 変更年月日 1990年 8月10日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号

氏 名 東洋紡績株式会社